pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 30, No. 2, pp. 173~177 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.2.173

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Rosa canina L. 중 hyperoside의 시험법 개발 연구

오재명 · 이화정 · 반경녀 · 서일원 · 이영주 · 이진희 · 박지민 · 강태석*
식품의약품안전평가원 영양기능연구팀

Development of Analytical Methods of Hyperoside from *Rosa canina* L.

Jae Myoung Oh, Hwa Jung Lee, Kyeong Nyeo Bahn, Il Won Seo,
Young Joo Lee, Jin Hee Lee, Ji Min Park, and Tae Seok Kang*
Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea
(Received December 4, 2014/Revised February 10, 2015/Accepted March 18, 2015)

ABSTRACT - *Rosa canina* L. is health functional food materials that can help to temporarily relieve symptoms of arthritis. This study has been conducted to develop and validate analytical methods for hyperoside of *Rosa canina* L.. Methods based on HPLC with ultraviolet detection (UVD) were established through instrumental analytical conditions, and the examination of data, such as domestic and foreign reliable methods and journals. HPLC UVD analysis using Capcell Pak C_{18} MG II column at 353 nm was determined on test through the column, mobile phase. The validation has been performed on the method to determine linearity, accuracy, limits of quantification (LOQ) and repeatability for hyperoside. The method showed high linearity in the calibration curve at a coefficient of correlation (R^2) of 0.999, and the LOQ was 0.393 μg/mL. Relative standard deviation (RSD) values of data from repeatability precision was between 0.6 and 2.6%. Recovery rate test at hyperoside scored between 98 and 99%. These results indicate that the established HPLC method is very useful for the determination of hyperoside in *Rosa canina* L. to develop a health functional material.

Key words : Health functional food, *Rosa Canina* L., hyperoside, HPLC, method validation

로즈힙(*Rosa Canina L*., dog rose)은 주로 유럽과 남미에 자생하는 장미과나무의 열매로서 일반적으로 봄에 열매가 맺기 시작해 늦은 여름이나 초가을에 성숙해진다. 전통적으로 하루에 2~5 g 정도의 분말을 섭취하는 것으로 알려져 있으며 특히, 항산화작용, 항염작용, 항비만작용, 항당뇨작용, 항괴양성위염작용, 항미생물작용, 항암 · 항돌연변이작용 등이 최근까지 관심을 끌어왔다[1,3]. 로즈힙은 전통적으로 자연 산화제 중 영양학적으로 가장 많은 이점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[4]. 전통적으로 민간요법에서는 로즈힙의 꽃잎, 잎, 과일 등이 신장염, 감기, 기관지염, 습진 및 가려움 등에 효과가 있는 것으로 나타났다[5]. 특히, 유럽 국가의 인체적용시험에서 관절염 증상을 감소시키는 것이 관찰되었다. 로즈힙분말 섭취후 WOMAC 지수 (관절통증, 뻣뻣함, 일상생활 불편함, 환자의 자가 진단)가 개선됨을 확인하였고, 관절염 약물 섭취량의 유의적인 결과가 관찰되었다[6-8]. 또한 기전연구에서는 로즈힙분말용매분획물을 처리하였을 때, 염증유발 관련 지표인 COX-1과 COX-2의 저해효과를 농도의존적으로 확인할 수 있었고[9,10], 로즈힙에탄올추출물을 먹인 동물시험에서는 발부종의 크기가 대조군 대비 유의적으로 감소하였다[11,12].

로즈힙은 비타민C, 플라보노이드, 카로티노이드, 탄닌과 같은 활성물질들을 많이 함유하고 있다[13]. 로즈힙에 들어있는 비타민 C는 과육에 많이 들어 있으며, 과일 및 채소 중에 가장 높은 비타민 C (30-1300 mg/100 g)를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[4]. 제 2차 세계대전 당시 비타민 C가 풍부한 로즈힙은 괴혈병을 예방하는 물질로써 사용되기도 하였다[5]. 또한, 비타민 C이외에도 미네랄, 카로티노이드, 아스코르빈산, 말산, 시트르산, 토코페놀, 플라보노이드, 탄닌, 펙틴, 당, 유기산, 아미노산, 필수 지방산 등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 마그네슘(Mg, 1909 mg/kg)외 13종의 미네랄과 펙틴(pectin), β-carotene, β-sitosterol 등은 다량 함유되어 있는 것으로 확인되었다[2,3]. Isoquercetin 또는 Quercetin 3'-glucoside라 불리는 hyperoside

*Correspondence to: Tae Seok Kang, Nutrition and Functional Food Research Team, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon-gun, Korea
Tel: 82-43-719-4401, Fax: 82-43-719-4400
E-mail: taska@korea.kr

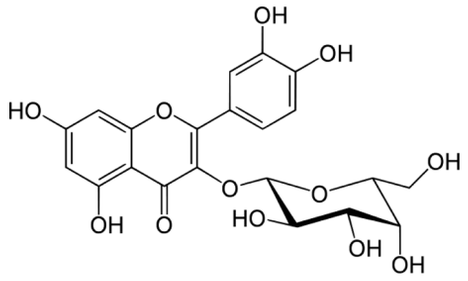

Fig. 1. Structure of hyperoside.

Table 1. Properties of physical chemistry of hyperoside

IUPAC name	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-[(3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-4H-chromene-4,5,7-triol
Other name	hyperozide, hyperasid, hyperosid, hyperin, quercetin galactoside, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-O-galactoside
Chemical formula	$C_{21}H_{20}O_{12}$
Molecular weight	464.38
Density	1.879 g/mL

는 로즈힙 분말과 같은 허브류 식물에 들어 있는 플라보노이드계 물질로써 중국 등에서는 전통적으로 신경보호, 항염증, 항산화 효과에 사용하고 있다[14,15]. 많은 약재에 존재하는 것으로 알려진 hyperoside(3-O-β-D-galactoside)는 플라보놀 배당체의 일종으로 항바이러스성 활성, 항통증, 항염증, 심혈관계 질환, 간보호 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[15]. 플라보노이드는 야채, 한약, 과일 및 콩과 식물에서 발견되는 다양한 폴리페놀 물질에 대한 통칭으로 적어도 5천종 이상의 플라보노이드가 지금까지 보고되어 있다. 이 플라보노이드 물질들은 항산화, 항균, 항바이러스, 항염증, 에스트로겐 유사작용, 항에스트로겐 작용, 항돌연변이 작용, 효소 활성화 및 효소 저해 작용 등 다양한 효과가 있음이 증명되었다. 사람을 대상으로 한 역학조사에서는 플라보노이드의 섭취량과 심장 관상혈관 질환의 발생과 반비례 관계가 있음이 발견되어, 플라보노이드류를 함유하는 식품은 약리학적 및 영양학적 측면에서 매우 유용한 건강기능식품으로 인식되어 있다[16].

이에 따라 본 연구에서는 USP[17] 등과 같은 국·내외 문헌 및 저널 검색을 통하여 로즈힙분말의 지표성분인 hyperoside의 시험법을 검토하고, 시험법 검증을 통한 시험법 확립을 수행하고자 하였다.

Materials and Methods

실험 재료

2012년부터 2013년까지의 품목제조 및 수입신고현황 전수조사를 통해 로즈힙 분말을 주원료로 한 8건의 건강기능식품을 선정하였고 인터넷, 마트 및 백화점에서 판매·유통되고 있는 2건의 분말 제품을 수거하여 분석에 이용하였다.

Table 2. Analytical conditions for the determination of hyperoside

· Column	Capcellpak C18 MG II (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm)		
· Oven Temperature	40°C		
· Mobile phase	A: 0.1% Phosphoric acid (in D.W) B: Acetonitrile		
· Gradient condition	min	0.1% Phosphoric acid	Acetonitrile
	0	92	8
	6	88	12
	26	74	26
	28	5	95
	33	5	95
	35	92	8
	40	92	8
· Flow rate	0.8 mL/min		
· Injection volume	10 μL		
· Detector	UV 353 nm		

시약

표준품으로 사용한 hyperoside 및 인산은 Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 메탄올은 Merck사(Whitehous station, USA), 아세토니트릴은 Busdick & Jackson사(SK Chemical, KOREA)로부터 HPLC급으로 각각 구입하여 사용하였다.

분석조건

Hyperoside 분석을 위해 HPLC (Nanospace SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan)를 이용하였으며 분석조건은 Table 2와 같다.

표준용액의 조제

Hyperoside를 60% 메탄올에 녹여 1,000 μg/mL의 농도가 되도록 한 액을 표준용액으로 하였다. 검량선 작성을 위하여 표준용액을 2, 5, 10, 20, 40, 60 μg/mL가 되도록 60% 메탄올을 이용하여 단계별로 희석하여 제조하였다.

시험용액의 조제

시료 1 g을 취하여 10 mL 부피플라스크에 60% 메탄올 7 mL과 함께 넣은 후, 50°C에서 60분 동안 초음파 추출하였다. 추출액은 방냉 후 60% 메탄올로 정용하여 시린지 필터(0.45 μm)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

Results and Discussion

크로마토그램

Fig. 2에는 10 μg/mL 농도의 hyperoside 표준용액을 HPLC

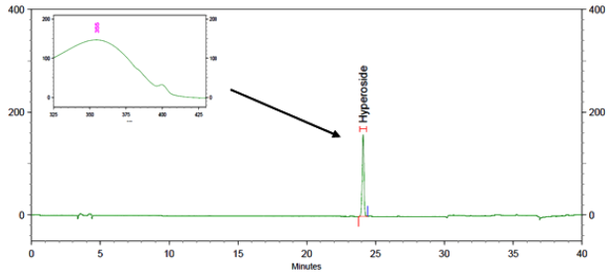

Fig. 2. Chromatogram of hyperoside standard solution by HPLC-UVD.

Table 3. Repeatability data of hyperoside[a] (n = 5)

Treatment	A[b]		
	1 g	2 g	3 g
1	63.22	64.45	66.52
2	64.26	63.99	65.69
3	64.27	63.83	70.10
4	66.32	64.90	68.95
5	66.23	64.10	67.68
Analytes mean (μg/g)	64.86	64.26	67.79
RSD (%)	2.10	0.67	2.63

[a]Evaluating on the HPLC systems at three concentration levels
[b]specimen sample

로 분석한 크로마토그램을 나타내었다.

분석법 검증

직선성

Hyperoside는 2~60 μg/mL의 농도범위에서 $r^2 = 0.999$이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었다.

검출한계 및 정량한계

표본시료를 분석한 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하여 3배를 곱한 값을 기울기 값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다[18-19]. 그 결과 hyperoside의 검출한계는 0.130 μg/mL이며, 정량한계는 0.393 μg/mL로 나타났다.

정밀성

반복시험(Repeatability)의 재현성과 분석일자별 정밀성(Intermediate Precision)을 측정하였다.

검체량의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 표본검체 1개를 선정하여 각각 1 g, 2 g, 3 g으로 검체를 취하여 5회 반복 측정하였다[18-19]. 각 농도의 상대표준편차를 확인한 결과 1x배, 2x배 및 3x배 채취 시 각각 2.10%, 0.67%, 2.63%임을 확인하였다(Table 3).

분석 시간의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 표본검체 1개를 선정하여 0 시간, 24 시간, 48 시간마다 시험조작 5회 반복 측정하였다[18-19]. 상대표준편차는 각각 2.10%, 1.73% 및 2.00%로 관찰되었다. 또한, 일간 정밀성의 상대표준편차를 확인한 결과 0.20%로 나타났다(Table 4).

Table 4. Intermediate precision data of hyperoside[a] (n = 5)

Treatment	A[b]		
	0 h	24 h	48 h
1	63.22	62.48	61.52
2	64.26	64.43	62.25
3	64.27	64.85	62.85
4	66.32	65.31	64.10
5	66.23	63.69	64.55
Daily Mean (μg/g)	64.86	64.16	63.05
Inter-day RSD (%)	2.10	1.73	2.00
Intra-day RSD (%)		0.20	

[a]Intermediate precision data using HPLC systems on different days
[b]specimen sample

Table 5. Accuracy data of hyperoside (n = 5)

Treatment	Fortified concentration (*u*g/mL)[a]		
	10.0	20.0	30.0
1	103.12	100.41	98.09
2	100.88	97.23	99.30
3	98.32	99.06	97.38
4	96.19	99.12	98.36
5	96.69	97.16	97.66
Recovery mean (%)	99.04	98.60	98.16
RSD (%)	2.95	1.41	0.75

[a]Concetration of hyperoside standard added in sample

정확성

전체 시료를 대표로 하는 표본 시료 1개에 대하여 각기 다른 농도를 Spiking/Recovery 방법으로 회수되는 백분율을 통해 매트릭스 영향을 검토하였다[18-19]. 표준물질 첨가법에 따라 단일분석용액에 대해 측정하고 같은 수준 및 원래 수준의 2x 및 3x배의 표준 분석물을 추가하는 방법을 사용하였다. 즉, 표본 시료에 대하여 일정량의 시료를 채취하고 표준용액을 첨가하였을 때 최종 농도가 시료에 존재하는 참값과 가장 가까운 근사값 농도인 10(1x배) μg/mL, 20(2x배) μg/mL, 30(3x배) μg/mL가 되도록 하였다. 그 결과 각각의 농도에서 회수율은 99.04%, 98.60%, 98.16%로 나타났으며, 상대표준편차는 2.95%, 1.41%, 0.75%로 관찰되었다(Table 5).

확립한 시험방법의 적합성 확인을 위해 유통 중인 건강기능식품 제품들을 분석하였다. 유통 중인 로즈힙분말 건강기능식품 제품은 2건으로 확인되었고, 2건의 제품을 조

Table 6. Monitoring results

Sample	Type	Label (mg/g)	Found (mg/g)	Result (%)
1	powder	0.084	0.068	81.0
2	powder	0.075	0.065	86.7

사한 결과, 지표성분의 기준규격 (표시량의 80~120%)이 적합한 것으로 확인되었다.

연구결과를 통하여 건강기능식품의 지표성분에 대한 시험방법을 마련하였으며, 건강기능식품의 품질관리에 적합한 건강기능식품공전 시험법 개정(안)의 기초자료 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2014년 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(14161식품안001)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 일시적으로 관절염 증상 완화에 효과가 있는 건강기능식품인 *Rosa Canina* L.의 지표성분인 hyperoside를 분석하였다. 국내・외 분석법과 저널들을 참고하여 hyperoside의 HPLC 분석법을 확립하였다. Hyperoside의 HPLC 분석법은 이동상과 컬럼에 대한 실험을 통하여 Capcell Pak C_{18} MG II 컬럼으로 353 nm으로 설정하였다. 시험 분석법 검증은 hyperoside에 대한 직선성, 정확성, 정량한계(LOQ) 및 정밀성을 수행하였다. Hyperoside은 2~60 μg/mL 농도에서 우수한 직선성(R^2 = 0.999)을 나타내었다. 정확성의 회수율은 98~99%로 관찰되었으며, LOQ는 0.393 μg/mL으로 나타났고, 재현성에 대한 정밀성은 상대표준편차가 0.6~2.6%로 관찰되었다.

References

1. Chrubasik C, Roufogalis BD, Muller-Lander U, Chrubasik S. A systematic review on the Rosa canina effect and efficacy profiles, *Phytother Res.* **22**, 725-733 (2008).
2. Basgel S, Erdemoğ.lu SB. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey, *Sci Total Environ.* **359**, 82-89 (2006).
3. Da-Eun Nam, Min-jae Lee, Namgil Kang, Geumduck Park, and Jeongmin Lee. A Comparative Study of Rose Hip Extracts on Osteoarthritis in Cartilage Cells, *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **41**(12), 1663-1670 (2012).
4. Loana R, Andreea S, Sorin S. Bioactive compound and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chemistry Central Journal*. **7**(73), 1-10 (2013).
5. Saeed C. A., Houshang N., Sepeideh J., Fatemeh H., Protective effect of *Rosa canina* L fruit extracts on renal disturbances induced by reperfusion injury in rats. *Kidney diseases*. **7**(4), 290-298 (2013).
6. Odd W, Sigrun S, Ewa H, Hanna M, Liv E. The effects of a standardized herbal remedy made from a subtype of Rosa canina in patients with osteoarthritis: a double blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Current therapeutic research.* **64**(1), 21-31 (2003).
7. Rein, E., Kharazmi, A., Winther, K., A herbal remedy, Hyben Vital (stand. Powder of a subspecies of Rosa canina fruits) reduces pain and improves general wellbeing in patients with osteoarthritis - a double-blind, placebo-controlled, randomised trial, *Phytomedicine.* **11**, 383-391 (2004).
8. Winther K1, Apel K, Thamsborg G. A powder made from seeds and shells of a rose-hip subspecies (*Rosa canina*) reduces symptoms of knee and hip osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *Scand J Rheumatol*. **34**(4), 302-308 (2005).
9. Jager, A.K., Eldeen, I.M.S., van Staden, J., COX-1 and COX-2 activity of rose hip, *Phytotherapy Research.* **21**, 1251-1252 (2007).
10. E.M. Wenzig, U. Widowitz, O. Kunert, S. Chrubasik. Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina L.*) preparations, *Phytomedicine*. **15**(10), 826-835 (2008).
11. Orhana D.D., Hartevioglu A., Kupeli E and Yesilada E., In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from Rosa canina L. Fruits, *Journal of Ethnopharmacology.* **112**, 394-400 (2007).
12. Lattanzioa F., Grecob E., Caretta D., Cervellatib R., Govonic P. and Speronia E., In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina L. Extract, J. of Ethnopharmacology.* **137**(1), 880-885 (2011).
13. ARTUR A., WALDEMER B., JERZY Z., SEBASTIAN M., Flavonoid and organic acid content in rose hips (Rosa L., SECT. CANINAE DC. EM. CHRIST), *Acta Biologica Cracoviesia Series Botanica.* **54**(1), 105-112 (2012).
14. Zhengyu Z., Mosha Silas Sethiel, Weizhi Shen, Sentai Liao, Yuxiao Zou., Hyperoside Downregulates the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Promotes Proliferation in ECV304 Cells via the c-Jun *N*-Terminal Kinases (JNK) Pathway Following Stimulation by Advanced Glycation End-Products *In Vitro, Int. J. Mol. Sci*. **14**, 22697-22707 (2013).
15. Lin-lin WU, Xin-bo YANG, Zhen-ming HUANG, He-zhi LIU, Guang-xia WU, In vivo and in vitro antiviral activity of hyperoside extracted from Abelmoschus manihot (L) medik, *Acta pharmacol Sin.* **28**(3), 404-409 (2007).
16. Kyu Hong Choe, Sun-Nam Choe, Jong-Jae Choo, Jeong-Yeol Lee, Jong-Yeon Kim, Ju-Wan Kim, Ji-Sung Choi, Ki-Seok Park, and Kwan Ha Park. Tissue Concentration of Quercetin, Isoquercitrin and Hyperoside, and Lipid Pro-

file Changes Following 8-week Feeding of Angelica Kieskei Powder in Rats, *Korean J. Food. Sci. Technol*. **39**(6), 721-724 (2007).
17. available online http://www.uspnf.com
18. ICH Harmonised tripartite guideline; Validation of analytical procedures test and methodology Q2 (R1).
19. AOAC Guideline for Single Laboratory Validation of Chemical Methosd for Dietary Supplements and Botanicals.